体外診断用医薬品

※※2013年９月改訂（第６版）
※2012年４月改訂

使用前に本添付文書をよく読むこと。

製造販売承認番号22100AMI00003000

インターフェロン−γ遊離試験キット

クォンティフェロン®TBゴールド

【重要な基本的注意】

1. 採血時は室内温度（22±5℃）になったクォンティフェロン®TBゴールド用採血管を使用すること。〔採血管の温度により採血管内の圧力が変化し、採血管内の内容物等が患者に逆流するおそれがある。また、採血時の温度が高いと、採血管の分離剤が軟化し、分離剤の成分と血液が混ざり誤った検査結果となるおそれがある。〕
2. 採血量は、採血管ラベルの黒い印の範囲（0.8〜1.2mL）であることを確認し、血液の量がこの範囲を外れた場合は、再採血すること（【用法・用量】3. 操作方法の項参照）。
3. 採血後の本採血管（３種類の採血管）を上下に５秒間又は10回振って混合すること。採血管の内表面全体が血液で覆われていることを確認すること。ただし、採血管を強く振りすぎないように注意すること（【用法・用量】3. 操作方法の項参照）。
4. 培養前の血液検体は、移送時にあっても22±5℃ で保存し、氷冷又は冷蔵しないこと。採血後の血液検体は、できるだけ早く（採血後16時間以内に）37℃ のインキュベーターに入れること。〔T細胞の活性が低下しIFN-γ産生応答が低くなる可能性がある。そのため感度が低下し正確な検査結果が得られないおそれがある。〕
5. 本検査は、細胞性免疫応答を利用した検査であり、HIV感染、AIDS、免疫系低下の可能性のある疾患、免疫抑制剤等により免疫抑制されている被検者では、本検査結果が偽陰性を示すことが考えられるので、判定に注意すること。また、血液検体の不適切な取扱い、試験操作の間違いにより、偽陰性となることがある（【測定結果の判定法】4. 判定上の注意の項参照）。
6. 本検査の結果が陽性の場合であっても、被検者の病歴、臨床所見に基づいて、総合的に判断すること。不適切な試験操作により偽陽性となることがある（【測定結果の判定法】4. 判定上の注意の項参照）。
7. 本検査は結核感染の診断補助であり、診断は他の関連する所見に基づき医師により総合的に行うこと。

【全般的な注意】

1. 本品は体外診断用であり、それ以外の目的に使用しないこと。
2. 診断は他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて総合的に判断すること。
3. 添付文書から逸脱した方法では、正しい結果が得られないので、使用前に添付文書をよく読むこと。添付文書以外の使用方法については保証しない。
4. クォンティフェロン®TBゴールド用採血管の添付文書及び使用する機器の取扱説明書をよく読んでから使用すること。

【形状・構造等（キットの構成）】

本品は下記試薬で構成されており、採血管部はクォンティフェロン®TBゴールド用採血管として医療機器の認証を取得している（認証番号：220AABZI00144000）。

ステージ１用（採血管部）	
1. TB抗原採血管（赤色キャップ） ・結核菌特異蛋白ESAT−6　1.0μg/本 ・結核菌特異蛋白CFP−10　1.0μg/本 ・結核菌特異蛋白TB7.7(p4)　1.0μg/本 ・ヘパリンリチウム　21 IU/mL	1本・50本
2. 陰性コントロール採血管（灰色キャップ） ・ヘパリンリチウム　21 IU/mL	1本・50本
3. 陽性コントロール採血管（紫色キャップ） ・ヘパリンリチウム　21 IU/mL	1本・50本

ステージ２用（ELISA部）	
4. 抗ヒトIFN−γ抗体固相化プレート ・抗ヒトインターフェロン−γモノクローナル抗体（動物種：マウス）　0.55μg/ウエル ・チメロサール　0.01w/v%含有	96ウエル×2枚
5. ヒトIFN−γ標準（凍結乾燥品） ・遺伝子組換えヒトインターフェロン−γ（溶解後８IU/mL）＊ ・チメロサール　0.01w/v%含有	１バイアル
6. 希釈緩衝液 ・チメロサール　0.01w/v%含有	30mL×1本
7. HRP標識抗ヒトIFN−γ抗体（凍結乾燥品） ・ペルオキシダーゼ標識抗ヒトインターフェロン−γモノクローナル抗体（動物種：マウス）（溶解後４μg/mL） ・チメロサール　0.01w/v%含有	１バイアル
※8. 濃縮洗浄用緩衝液	100mL×1本
9. 酵素基質液 ・3, 3', 5, 5'−テトラメチルベンジジン　0.02w/v%含有 ・過酸化水素　0.014 w/v%含有	30mL×1本
10. 酵素反応停止液 ・硫酸　0.5mol/L含有	15mL×1本

＊IU（International Unit）：米国NIH（National Institutes of Health）の標準品で示されるインターフェロン−γの量

【使用目的】

全血の結核菌特異蛋白との共培養による遊離インターフェロン−γの測定

1. 活動性結核の診断補助
   X線所見や喀痰塗抹標本で結核を確定できず、他の臨床所見等で、結核を疑う者
2. 潜在結核の診断補助
   (1) 接触者健康診断として、集団発生の際の感染性結核患者との接触者
   (2) 感染性結核患者との接触機会の多い医療従事者

【測定原理】

結核は、結核患者からの飛沫核に含まれる結核菌の感染によって起こる感染症である。しかし感染者のうち発病するのは一部で、その他の感染者は発病しない（潜在性結核感染）。

体内に結核菌が侵入すると、結核菌はマクロファージに貪食され、その抗原情報がTリンパ球に提示される。これによりTリンパ球は結核菌の抗原で感作される。この結核感染者の血液を結核菌特異抗原とともに培養することにより、血液中の感作Tリンパ球からIFN−γが分泌される。この分泌されたIFN−γをELISA法を用いて測定することにより、結核菌の感染の有無を診断する[1)]。

本品で使用する結核菌特異抗原（ESAT−6、CFP−10、TB7.7）は、すべてのBCG株と*M. kansasii, M. szulgai* 及び *M. marinum* を除くほとんどの非結核性抗酸菌には存在しない。このためBCGワクチン接種の影響を受けずに、結核菌感染を診断することができる[2)〜6)]。

本キットによる測定は、２つのステージで行われる。

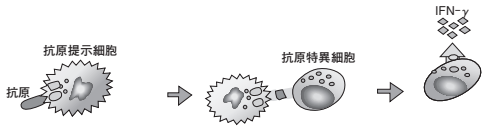
ステージ１では、まずTB抗原採血管、陰性コントロール採血管及び陽性コントロール採血管それぞれに全血を採血後、静置培養する。被検者が結核菌に感染していると、感作Ｔリンパ球がインターフェロン-γ（IFN-γ）を産生する。

ステージ２は、この全血から上清（血漿検体）を採取し、サンドイッチ酵素免疫測定（ELISA）法にてIFN-γ量を測定する。予め、IFN-γ標準希釈系列を作製しておき、検体と共に測定する。得られた吸光度から、IFN-γの標準曲線を作成し、検体中のIFN-γ量を算出する。

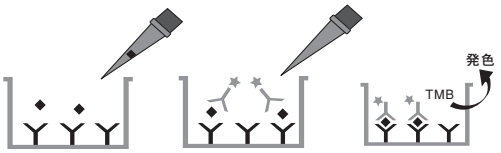
IFN-γ測定値が、陽性カットオフ値以上の場合、被検者は結核菌感染陽性、陰性カットオフ値未満の場合は陰性、陰性カットオフ値以上陽性カットオフ値未満の場合は「判定保留」と判定する。

原理図

ステージ１：血液の培養



ステージ２：ヒトIFN-γの測定



【操作上の注意】

1. 下記の留意事項から逸脱した検体は、本検査の結果が正しく得られないことがあるので、使用しないこと。
   (1) 血液検体の移送は22±5℃で行い、氷冷又は冷蔵してはならない。
   (2) 採血後の採血管は出来るだけ早く（採血後16時間以内に）、37℃のインキュベーターに入れること。
2. 下記の検体は本検査結果が偽陽性となる場合があるので使用しない。
   5%以上の溶血が見られる検体
3. 妨害物質
   本検査において、各妨害物質は以下の濃度まで影響を与えない。
   ビリルビンＦ：19.7 mg/dL
   ビリルビンＣ：21.8 mg/dL
   乳び：1890 FTU
   ヘモグロビン：487 mg/dL
4. 交差反応性
   IL-1βは250 ng/mL、IL-2は50 U/mL、その他のサイトカイン（IL-1α, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12）は50 ng/mLまで、本品の測定値に影響を与えない。

【用法・用量（操作方法）】

1. 試薬の調製方法

(1) ステージ１

クォンティフェロン®TBゴールド用採血管（TB抗原採血管、陰性コントロール採血管、陽性コントロール採血管）は、そのまま用いる。

(2) ステージ２

HRP標識抗ヒトIFN-γ抗体を除くすべての構成試薬は、使用する前に22±5℃に少なくとも60分間放置した後、調製する。

① 抗ヒトIFN－γ抗体固相化プレートの準備

使用しないストリップは枠からはずし、すみやかに袋に戻し、密封して次回使用するまで2～8℃で保存する。

標準曲線作成用に少なくとも１ストリップ、被検者の数に十分なストリップ（プレートの配置例は図１を参照）が必要である。使用後、未使用のストリップが残る場合は、枠と蓋は次回の測定に必要であるため残す。

図１ 検体配置例

標準三重測定の場合

列	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1N	1A	1M	S1	S1	S1	13N	13A	13M	21N	21A	21M
B	2N	2A	2M	S2	S2	S2	14N	14A	14M	22N	22A	22M
C	3N	3A	3M	S3	S3	S3	15N	15A	15M	23N	23A	23M
D	4N	4A	4M	S4	S4	S4	16N	16A	16M	24N	24A	24M
E	5N	5A	5M	9N	9A	9M	17N	17A	17M	25N	25A	25M
F	6N	6A	6M	10N	10A	10M	18N	18A	18M	26N	26A	26M
G	7N	7A	7M	11N	11A	11M	19N	19A	19M	27N	27A	27M
H	8N	8A	8M	12N	12A	12M	20N	20A	20M	28N	28A	28M

標準二重測定の場合

列	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1N	1A	1M	S1	S1	13N	14N	14A	14M	22N	22A	22M
B	2N	2A	2M	S2	S2	13A	15N	15A	15M	23N	23A	23M
C	3N	3A	3M	S3	S3	13M	16N	16A	16M	24N	24A	24M
D	4N	4A	4M	S4	S4		17N	17A	17M	25N	25A	25M
E	5N	5A	5M	9N	9A	9M	18N	18A	18M	26N	26A	26M
F	6N	6A	6M	10N	10A	10M	19N	19A	19M	27N	27A	27M
G	7N	7A	7M	11N	11A	11M	20N	20A	20M	28N	28A	28M
H	8N	8A	8M	12N	12A	12M	21N	21A	21M	29N	29A	29M

S1 ：標準1、S2：標準2、S3：標準3、S4：標準4
1N：検体1　陰性コントロール血漿
1A：検体1　TB抗原血漿
1M：検体1　陽性コントロール血漿

② ヒトIFN－γ標準液の調製及び希釈系列の作製

ヒトIFN-γ標準を**バイアルラベルに記載されている量の**精製水で溶解し、「ヒトIFN-γ標準液」を調製する。このとき泡立てないよう穏やかに撹拌し、**完全に溶解**させる。規定量で溶解したときのヒトIFN-γ標準液の濃度は、8.0 IU/mLとなる。

〈注意〉

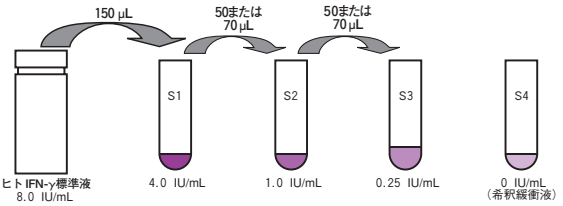
- 溶解後のヒトIFN-γ標準液の容量はロット毎に異なる。
- 溶解したヒトIFN-γ標準液を希釈緩衝液を用いて、４希釈系列を一つ作製する。（図２参照）
- S1（標準１）は４IU/mL、S2（標準２）は１IU/mL、S3（標準３）は0.25 IU/mL及びS4（標準４）は０IU/mL（希釈緩衝液のみ）のIFN-γを含有する。標準は少なくとも二重測定する。
- ヒトIFN-γ標準希釈系列はELISAを行う毎に作製する。
- 溶解後のヒトIFN-γ標準液は2～8℃で３カ月間保存できる。溶解日を記録しておく。

三重測定用標準液の調製法

a. ４本のサンプルチューブに“S1”、“S2”、“S3”、“S4”と記載する。
b. 150μLの希釈緩衝液をS1に、210μLの希釈緩衝液をS2、S3、S4に加える。
c. 150μLのヒトIFN-γ標準液をS1に加えよく撹拌する。
d. 70μLのS1をS2に加えよく撹拌する。
e. 70μLのS2をS3に加えよく撹拌する。
f. 希釈緩衝液のみをゼロ標準（S4）とする。

二重測定用標準液の調製法
a. 4本のサンプルチューブに“S1”、“S2”、“S3”、“S4”と記載する。
b. 150μLの希釈緩衝液をS1、S2、S3、S4に加える。
c. 150μLのヒトIFN-γ標準液をS1に加えよく撹拌する。
d. 50μLのS1をS2に加えよく撹拌する。
e. 50μLのS2をS3に加えよく撹拌する。
f. 希釈緩衝液のみをゼロ標準（S4）とする。

図2 標準希釈系列の作製



③ HRP標識抗ヒトIFNーγ抗体液の調製

HRP標識抗ヒトIFN-γ抗体を精製水0.3mLで溶解し、HRP標識抗ヒトIFN-γ抗体濃縮液を調製する。このとき泡立てないように穏やかに撹拌して完全に溶解させる。

使用濃度のHRP標識抗ヒトIFN-γ抗体液は、表1のHRP標識抗ヒトIFN-γ抗体液の調製表を参考に、HRP標識抗ヒトIFN-γ抗体濃縮液の必要量をスピッツ管に取り、希釈緩衝液で希釈し調製する。

表1 HRP標識抗ヒトIFNーγ抗体液の調製表

ストリップの本数	濃縮液の量（μL）	希釈緩衝液の量（mL）
2	10	1.0
3	15	1.5
4	20	2.0
5	25	2.5
6	30	3.0
7	35	3.5
8	40	4.0
9	45	4.5
10	50	5.0
11	55	5.5
12	60	6.0

〈注意〉
- 調製の際は、添付の希釈緩衝液のみを用いる。
- 使用濃度に調製したHRP標識抗ヒトIFN-γ抗体液は、6時間以内に使用する。
- 溶解後の残ったHRP標識抗ヒトIFN-γ抗体濃縮液は、使用後ただちに2～8℃に戻し、3カ月以内に使用する。溶解日を記録しておく。

④ 洗浄用緩衝液の作製

濃縮洗浄用緩衝液を精製水で20倍に希釈後、よく撹拌し洗浄用緩衝液とする。2Lの洗浄用緩衝液を調製するのに十分な量の濃縮洗浄用緩衝液が添付してある。

〈注意〉
- 使用濃度に調製した洗浄用緩衝液は、22±5℃で2週間保存できる。調製日を記録しておく。

2. 必要な器具・機器等

(1) ステージ1
- マイクロピペット（300μL～400μL採取可能なもの）及びチップ
- 蓋付き1.2mLサンプルチューブ及びチューブ立て
- 37℃インキュベーター（CO_2インキュベーターでなくてもよい）
- 遠心分離器
- クリーンベンチ又は安全キャビネット
- 感染の危険性のある血液を取り扱うための手袋、作業衣服、保護眼鏡等

(2) ステージ2
- マイクロピペット（10μL～1000μL量りとれるもの）及びチップ
- 8チャンネルマイクロピペット（50μL及び100μL）及びチップ
- サンプルチューブ
- スピッツ管
- メスシリンダー（1L又は2L）
- ポリプロピレン製リザーバー
- 滅菌済みメスピペット（5mL又は10mL）
- ミキサー
- タイマー
- マイクロプレートシェーカー
- マイクロプレートウォッシャー（自動ウォッシャーを推奨）
- マイクロプレートリーダー（フィルター：測定用450nm、対照用620～650nm）
- 感染の危険性のある血液を取り扱うための手袋、作業衣服、保護眼鏡等
- 精製水

3. 操作方法

(1) ステージ1

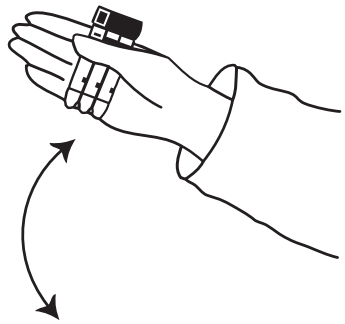
① それぞれのクォンティフェロン®TBゴールド用採血管に被検者の血液を直接静脈穿刺により、各1mLずつ採取する。
- 採血管が室内温度（22±5℃）に戻らないうちに採血を行わないこと。採血管の温度により採血管内の圧力が変化し、採血管内の内容物が体内に逆流するおそれがある。また、採血時の温度が高いと、採血管の分離剤が軟化し、分離剤の成分と血液が混ざり誤った検査結果となるおそれがある。
- 患者の腕及び採血管が採血中常に下向きであることを確認すること。
- 本採血管は比較的ゆっくり血液を吸引するので、規定量が吸引されたことを確認すること。
- 本採血管は1.0mL±10%の血液が吸引できるように製造されているが、駆血帯の影響等により採血量がこの範囲を外れることがある。
- 採血量は、採血管ラベルの黒い印の範囲（0.8～1.2mL）であれば検査結果に影響がない。もし血液の量がこの範囲を外れた場合は、正しい検査結果が保証できないため、再採血すること。
- 採血は特定の順序で行う必要はないが、通常は陰性コントロール、TB抗原、陽性コントロール採血管の順序で行う。
- 翼付針チューブ（翼付採血セット）を使用して採血する際は、以下の事項に注意すること。
  1）本採血管の位置が上下に動かないようにすること。〔採血管内圧と静脈圧の関係から採血管内の内容物が逆流する可能性がある。〕
  2）本採血管で採血を開始する前に他の市販の一般的な真空採血管を用いてチューブ内の空気を抜き、チューブに血液が満たされていることを確認すること。〔本採血管は、検査に必要な採血量が吸引できるように減圧されており、チューブ内に空気が残っていると採血量が不正確になる可能性がある。〕
  3）本採血管を採血管ラベルの黒い印が見えるように立てた状態にし、規定量が採血された時に採血管をはずすこと。
- シリンジ採血後、本採血管に分注する場合は、針刺し事故及び血液凝固に十分注意し、それぞれの採血管に規定量を分注すること。

② 採血後、採血管を**上下に５秒間又は10回振って混合する。採血管内壁にコーティングされているヘパリンと抗原を、採血後すみやかに血液と完全に混合することが最も重要である。**採血管を激しく振る必要はないが、**採血管の内表面全体が血液で覆われていることを確認すること。**血液が泡立つことがあるが、差し支えない。

・ 採血管を強く振りすぎると、分離剤の成分が血液と混ざり、誤った結果になることがあるので注意する。

・ 採血管の振り方については、図３を参照のこと。

図３　採血管の振り方



・ 採血管のラベルに適宜被検者の情報を記入する。

③ 採血管を**立てた状態**で37℃のインキュベーターで16～24時間培養する。

・ 採血管は出来るだけ早く（採血後16時間以内に）37℃のインキュベーターで培養を開始する。培養前の採血管は22±5℃に保存する。これ以外の温度で保存すると誤った結果になることがある。血液検体を冷蔵又は冷凍してはならない。

・ 採血後血液をすぐに培養できない時は、培養直前に再度採血管を上下に５秒間又は10回振ること。

・ インキュベーターは、CO_2あるいは加湿機能を必要としない。

④ 培養後採血管を2,000～3,000RCF（g）で15分間遠心分離する。ゲルにより血漿と細胞を分離できる。もし分離できなかった場合は、採血管を再度高い回転数で遠心分離する。

・ 培養後の採血管は、遠心分離前に2～27℃で３日間保存できる。

・ 血漿検体は、採血管から直接本品のELISAに使用できる。

・ 血漿検体は、2～8℃で28日間、－20℃以下（好ましくは－70℃以下）で少なくとも３ヵ月間保存可能である。

・ 血漿検体は遠心分離後の採血管のまま、あるいはサンプルチューブに入れ、ELISAを行うまで保存することができる。ただし、血漿検体を採血管に入れたまま凍結保存しないこと。

・ 血漿検体をサンプルチューブに移し替えるときは、分離剤及び沈殿物を吸い上げないように注意する。また、検体の流出と蒸発防止のためにシールしておく。

(2)　ステージ２

① 測定前に血漿検体を22±5℃に少なくとも60分間放置する。凍結保存されていた血漿検体はよく撹拌する。

② HRP標識抗ヒトIFN-γ抗体液を抗ヒトIFN-γ抗体固相化プレートの各ウエルに50μLずつ分注する。

③ 血漿検体を50μLずつ分注する。採血管から直接血漿検体を採取するときは、分離剤及び沈殿物が混入しないように注意する。汚染を防ぐため、チップはウエルごとに交換する。次にヒトIFN-γ標準液の各希釈濃度（S1～S4）を50μLずつ分注する（配置例は図１を参照）。

④ マイクロプレートシェーカーを用いて1分間よく混合する。

⑤ プレートに蓋をして22±5℃で120±5分間反応させる。反応中は直射日光を避けること。

⑥ 反応終了後に、各ウエルを400μLの洗浄用緩衝液で**少なくとも**６回洗浄する。自動プレートウォッシャーの使用を推奨する。

・ 洗浄は非常に重要である。洗浄は各サイクルで各ウエルの最上部まで洗浄用緩衝液を完全に満たす。各サイクルで少なくとも５秒間浸漬すること。

⑦ プレートを逆さにしてペーパータオルの上で軽く叩いて洗浄用緩衝液を完全に除去する。

⑧ 各ウエルに酵素基質液を100μLずつ添加し、マイクロプレートシェーカーを用いて１分間よく混合する。

⑨ プレートに蓋をして22±5℃で30分間反応させる。この際、直射日光を避けること。

⑩ 反応終了後、⑧で酵素基質液を添加した時と同じ順序と時間間隔で各ウエルに酵素反応停止液を50μLずつ加えてよく混合する。

⑪ 反応停止後５分以内に各ウエルの吸光度（OD）（測定波長：450nm、対照：620～650nm）をマイクロプレートリーダーで測定する。この吸光度の値から測定結果を計算する。

【測定結果の判定法】

1.　解析ソフトウェアを使用する場合

本検査の測定結果とデータの計算結果の解析に用いるクォンティフェロンTBゴールド解析ソフトは、http://www.bcg.gr.jp/index.html から入手できる。

このソフトは、測定の品質管理評価、標準曲線の作成とそれぞれの被検者の結果を基に判定を行う（詳細は3. 結果の解釈の項参照）。

2.　解析ソフトを使用せず、市販の表計算プログラムを使用する場合

(1)　標準曲線の作成と検体の値

① それぞれのプレートで多重測定したヒトIFN-γ標準液（S1～S4）の吸光度の平均値を計算する。

② 標準のIFN-γ濃度（IU/mL）の自然対数値（x軸）に対応する平均吸光度の自然対数値をy軸にプロットし、log-log標準曲線を作図する。このときS4（0 IU/mL）は除外する。

③ 回帰分析により最適な標準曲線を求める。最適な回帰式は $Y = a(X) + b$ で表される。Yは各血漿検体の吸光度の自然対数値、XはIFN-γ濃度（IU/mL）の自然対数値、aは変数Xに対する傾き、bはY軸の切片である。

④ 標準曲線から、それぞれの検体の吸光度に対するIFN-γ濃度（IU/mL）を計算する。

⑤ これらの計算は、マイクロプレートリーダー付属のソフト、標準的な表計算ソフトあるいは統計ソフトで行うこともできる。

⑥ これらのソフトで回帰式、標準の変動係数（% CV）及び標準曲線の相関係数（r）を計算することを推奨する。

(2)　試験の品質管理

以下の基準に適合しなかった場合は再試験を実施すること。解析ソフトは、これらの試験の検証を行うことができる。

① ヒトIFN-γ標準液（S1）の吸光度は0.600以上である。

② ヒトIFN-γ標準液（S1）と（S2）の吸光度の変動係数（%CV）は15%以下である。

③ ヒトIFN-γ標準液（S3）と希釈緩衝液（S4）の吸光度は、それぞれの吸光度の平均の±0.040以内である。

④ IFN-γの標準曲線の相関係数（r）は0.98以上である。

希釈緩衝液（S4）の平均吸光度は0.150以下である。平均吸光度が0.150より大きい場合はプレートの洗浄工程を検証すること。

(3)　結果の計算

各検体の測定値は、TB抗原血漿と陽性コントロール血漿のIFN-γ濃度（IU/mL）から、それぞれ陰性コントロール血漿のIFN-γ濃度（IU/mL）を減じて求める。これらの測定値を結果の解釈に用いる。

測定値A（IU/mL）＝IFN-γ A[注1)] － IFN-γ N[注3)]
測定値M（IU/mL）＝IFN-γ M[注2)] － IFN-γ N[注3)]
注1）IFN-γ A：TB抗原血漿のIFN-γ濃度（IU/mL）
注2）IFN-γ M：陽性コントロール血漿のIFN-γ濃度（IU/mL）
注3）IFN-γ N：陰性コントロール血漿のIFN-γ濃度（IU/mL）

3. 結果の解釈

本検査の結果は、以下の基準による：

測定値M（IU/mL）*1	測定値A（IU/mL）	結果	解釈
不問	0.35以上	陽性	結核感染を疑う
0.5以上	0.1以上 0.35未満	判定保留	感染リスクの度合いを考慮し、総合的に判断する
	0.1未満	陰性	結核感染していない
0.5未満	0.35未満	判定不可	免疫不全等が考えられるので、判定を行わない

＊1　陽性コントロール（場合によってはTB抗原）の応答は、通常マイクロプレートリーダーの測定範囲外であっても、これは試験結果に影響はない。10 IU/mLを超える値は、解析ソフトでは＞10 IU/mLと報告される。

測定値Aが0.35 IU/mL以上は「陽性」とし結核感染を疑う。測定値Aが0.1 IU/mL未満は「陰性」として結核非感染とし、0.1 IU/mL以上0.35 IU/mL未満を「判定保留」とし、感染のリスクの度合い（例えば、被検者の感染源との接触の濃密さ、接触期間及び感染源の排菌状況、咳の状況など）を考慮し、経過観察し、再測定などして総合的に判定する。

ただし、測定値Aが0.35 IU/mL未満であっても、測定値Mが0.5 IU/mL未満の場合は、免疫不全等が考えられるので判定を行わず、「判定不可」とする。

4. 判定上の注意

(1) 本検査の結果が陰性の場合であっても、潜在性結核感染あるいは結核の可能性を否定するものではない。感染の段階（例えば、細胞性免疫応答が進展する前に得られた検体）、合併症により免疫機能に影響を受けている状態、血液検体の不適切な取り扱い、操作の間違いにより、偽陰性を示すことがある。

(2) 本検査の結果が陰性であっても、結核感染の可能性を示す臨床所見、病歴及び結核発症リスクに関して考慮しなければならない。特に免疫機能が損なわれた被検者には注意が必要である。

(3) 本検査の結果が陽性の場合であっても、被検者の病歴、臨床所見に基づいて、総合的に判断すること。不適切な試験操作により、偽陽性を示すことがある。

(4) 本検査の結果が陽性であった場合、塗抹検査や培養検査、胸部X線検査等により活動性結核の診断を行うこと。

(5) ESAT-6、CFP-10及びTB7.7（p4）は、すべてのBCG株とほとんどの非結核性抗酸菌に存在しないが、*M. kansasii, M. szulgai, M. marinum* にはESAT-6、CFP-10の存在が知られているため、これらの感染によっても、本検査結果が陽性となることがある。結核菌と非結核性抗酸菌との鑑別をするためには、分離培養法、ＰＣＲ法等により、菌の同定を行うこと。

(6) 測定されたIFN-γ値の大きさは、感染の段階や程度、免疫応答の度合いあるいは活動性への進展の可能性と相関させることは出来ない。

(7) 本検査でのリンパ球数の影響については知られていない。信頼できる結果を得るために必要なリンパ球数は立証されていない。

(8) 以下に示すような疾患や治療を受けている患者又は特殊な被検者については注意すること。

① 以下のような疾患や治療を受けている患者検体は、本検査結果が偽陰性を示すことが考えられるので、判定に注意すること。

・HIV感染、AIDS、臓器移植等により免疫抑制されている者
・糖尿病、ケイ肺症、慢性腎不全、血液病（白血病、リンパ腫等）、その他特定の悪性腫瘍（頭部癌、頸部癌、肺癌等）等により免疫系低下の可能性のある症例
・免疫抑制剤（コルチコステロイド、メトトレキサート、アザチオプリン、化学療法等）等により免疫抑制されている者

② 以下のような特殊な被検者は、使用経験が少なく、有用性が確認されていないので注意すること。

・妊婦
・17歳以下の症例
・現在薬剤を投与されている患者
・過去に結核に感染し、治療を行った者

(9) 本検査から得られた結果は、被検者の病歴、現在の臨床所見及び他の検査結果と併せて判断しなければならない。

【性能】

1. 感度試験

(1) 4 IU/mLのIFN-γ標準液（S1）を試料として測定するとき、その吸光度は0.600以上である。
(2) 0 IU/mLの希釈緩衝液（S4）を試料として測定するとき、その吸光度は0.150以下である。

2. 正確性試験

(1) 4 IU/mLのIFN-γ標準液（S1）を試料として測定するとき、その吸光度は0.600以上である。
(2) 1 IU/mLのIFN-γ標準液（S2）を試料として測定するとき、その吸光度は0.200以上である。
(3) 0.25 IU/mLのIFN-γ標準液（S3）を試料として測定するとき、その吸光度は0.050以上である。

3. 同時再現性試験

(1) 4 IU/mLのIFN-γ標準液（S1）を試料として6回同時に測定するとき、吸光度の変動係数（CV(%)）は15%以下である。
(2) 1 IU/mLのIFN-γ標準液（S2）を試料として6回同時に測定するとき、吸光度の変動係数（CV(%)）は15%以下である。
(3) 0.25 IU/mLのIFN-γ標準液（S3）を試料として6回同時に測定するとき、吸光度はその平均値の±0.040以内である。
(4) 0 IU/mLの希釈緩衝液（S4）を試料として6回同時に測定するとき、吸光度はその平均値の±0.040以内である。

4. 測定範囲

0.05～15.0 IU/mL

5. 較正用基準物質

ヒトIFN-γ標準：米国国立衛生研究所（NIH：National Institutes of Health）の標準品（カタログ番号：Gxg01-902-535）

6. 相関性

本品とクォンティフェロン®TB-2Gの比較 [7)より一部改変]

活動性結核患者95名を対象に本品とクォンティフェロン®TB-2G（対照品）で検査を行った結果は表2のとおりであった。

表2　結核患者における本品と対照品の比較

		本品			
		陽性	判定保留	陰性	計
対照品	陽性	79	1	0	84.2%（80/95）
	判定保留	8	1	0	9.5%（9/95）
	陰性	2	2	2	6.3%（6/95）
	計	93.7%（89/95）	4.2%（4/95）	2.1%（2/95）	95

一致率86.3%（82/95）
陽性一致率98.8%（79/80）、判定保留一致率11.1%（1/9）、
陰性一致率33.3%（2/6）

また、健常者160名を対象に本品と対照品で検査を行った結果は表3のとおりであった。

表3　健常者における本品と対照品の比較

		本品			
		陽性	判定保留	陰性	計
対照品	陽性	1	0	1	1.3%(2/160)
	判定保留	0	3	11	8.8%(14/160)
	陰性	1	5	138	90.0%(144/160)
	計	1.3% (2/160)	5.0% (8/160)	93.8% (150/160)	160

一致率88.8%（142/160）
陽性一致率50.0%（1/2）、判定保留一致率21.4%（3/14）、
陰性一致率95.8%（138/144）

7.　有病正診率及び無病正診率

本品の有病正診率、無病正診率及び診断効率を表4に示す。

表4

有病正診率	93.7%(89/95)
無病正診率	93.8%(150/160)
診断効率	93.7%(239/255)

【使用上又は取扱い上の注意】

1. ヒト由来の検体は、感染を引き起こす可能性があるものとして取り扱いに注意し、適切に廃棄する。
2. 感染を避けるため、口によるピペッティングを行わないこと。
3. 酵素基質液は常に直射日光を避ける。
4. 酵素基質液は、3, 3', 5, 5'－テトラメチルベンジジンを含有しているので、摂取、吸入及び皮膚接触すると有害である。皮膚や目を刺激から避けるため、保護眼鏡、手袋を着用し、取り扱うこと。
5. 酵素反応停止液は硫酸を含有しているので、摂取、吸入あるいは目、皮膚に接触すると有害である。保護眼鏡、手袋を着用し、取り扱う。もし、皮膚や目に触れたときは多量の水で洗浄し、医師に相談すること。
6. ヒトIFN-γ標準液とHRP標識抗ヒトIFN-γ抗体濃縮液は、アレルギーを起こすことがあるので、手袋を着用し取り扱うこと。
※7. 濃縮洗浄用緩衝液、酵素基質液及び酵素反応停止液以外の構成試薬には保存剤としてチメロサールが含まれている。毒性があるので、摂取、吸入あるいは皮膚接触しないよう、取り扱いに注意する。また、チメロサールを含む廃液は、規制に従って廃棄すること。
8. 希釈緩衝液は、正常マウス血清とカゼインを含有し、アレルギー反応を引き起こすことがあるため皮膚への接触を避ける。
9. もし使用前の試薬容器に漏れや破損が認められた場合は使用しないこと。
10. 異なるロット番号のキットのELISA試薬を組み合わせて用いてはならない。
11. 残った試薬や生物試料は、各種法規に従って廃棄すること。
12. 有効期限を過ぎた採血管や試薬は使用しないこと。
13. 判定不可結果

判定不可結果はまれであり、被検者の免疫状態に関連すると思われるが、いくつかの技術的な要因も関連している可能性がある。

・ 採血から37℃での培養まで16時間以上経過した
・ 血液の保存が規定の温度範囲（22±5℃）を逸脱した
・ 採血管の混合が不十分であった
・ ELISAプレートの洗浄が不十分であった

血液検体の採取又は取り扱いで技術的な問題が疑われた場合は、新しい血液検体で本品での検査を再度行う。抗原刺激後の血漿での再ELISA検査は、ELISA検査において不適切な洗浄や他の操作法の逸脱が疑われた場合に行う。低い陽性コントロール値による判定不可は、ELISA検査の失敗でない限り、再検査による変化は期待できない。

14. 凝固した血漿検体

血漿検体の長期間保存によりフィブリンクロットが生じた場合は、検体を遠心分離によりクロットを沈殿させ、上澄の血漿を採取する。

15. トラブル解決法

非特異的な発色がある

考えられる原因	解決方法
プレートの不十分な洗浄	プレートの洗浄は400μL/ウエルで最低6回行うこと。使用する洗浄機によっては、6回以上の洗浄サイクルが必要な場合もある。各サイクル間の浸漬時間を5秒以上にする。
ELISAウエルの交差汚染	検体の分注及び混和に注意を払ってリスクを最小限にする。
試薬の期限切れ	キットは有効期限内に使用する。溶解したIFN-γ標準及び標識抗体濃縮液は、溶解日から3ヵ月以内に使用する。
酵素基質液の汚染	基質が青色になっていたら廃棄する。汚染のない試薬を用いる。

標準の吸光度が低い

考えられる原因	解決方法
IFN-γ標準の希釈ミス	IFN-γ標準は、添付文書に従って正しく希釈し調製する。
分注ミス	ピペットを使用説明書に従って較正して用いる。
反応温度が低い	ELISA法における反応は、22±5℃で行う。
反応時間が短い	標識抗体液、IFN-γ標準、検体を入れたプレートを120±5分間反応させる。酵素基質液を添加したプレートを30分間反応させる。
誤ったプレートリーダーフィルタを使用している	620～650 nmの対照フィルタを用い、450 nmで吸光度測定を行う。
試薬温度が低い	標識抗体濃縮液以外の試薬はすべて、測定開始前に22±5℃に戻す必要がある。これには約1時間かかる。
試薬の期限切れ	キットは有効期限内に使用する。溶解したIFN-γ標準及び標識抗体濃縮液は、溶解日から3ヵ月以内に使用する。

バックグラウンドが高い

考えられる原因	解決方法
プレートの不十分な洗浄	プレートの洗浄は400μL/ウエルで最低6回行うこと。使用する洗浄機によっては、6回以上の洗浄サイクルが必要な場合もある。各サイクル間の浸漬時間を5秒以上にする。
反応温度が高い	ELISA法における反応は、22±5℃で行う。
試薬の期限切れ	キットは有効期限内に使用する。溶解したIFN-γ標準及び標識抗体濃縮液は、溶解日から3ヵ月以内に使用する。
酵素基質液の汚染	基質が青色になっていたら廃棄する。汚染のない試薬を用いる。

標準曲線の不良とバラツキ

考えられる原因	解決方法
プレートの不十分な洗浄	プレートの洗浄は400μL/ウエルで最低6回行うこと。使用する洗浄機によっては、6回以上の洗浄サイクルが必要な場合もある。各サイクル間の浸漬時間を5秒以上にする。
IFN-γ標準の希釈ミス	IFN-γ標準は、添付文書に従って正しく希釈し調製する。

考えられる原因	解決方法
試薬の混合不足	試薬をプレートに加える前に、転倒あるいは穏やかなボルテックスにより完全に混和する。
一貫性のないピペット技術あるいは試験準備の中断	検体とIFN-γ標準の添加は連続的に行う。すべての試薬は試験前に準備する。

【貯蔵方法・有効期間】

採血管部の各採血管： 4～25℃で保存　有効期間15ヵ月
ELISA部の各構成試薬： 2～8℃で保存　有効期間24ヵ月
（有効期限は外箱に表示）

【包装単位】

採血管部： 1検体用，50検体用
ELISA部：192テスト（最大58検体）用

【主要文献】

1) Laurens A.H., et al.：Diagnosis of Tuberculosis Based on the Two Specific Antigens ESAT-6 and CFP-10. Clin Diagn Lab Immunol 2000 Mar.；7(2)：155-160.
2) Andersen P., et al.：Recall of Long-Lived Immunity to *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Mice. J Immunol 1995 Apr.；154(7)：3359-3372.
3) Sørensen AL., et al.：Purification and Characterization of a Low-Molecular-Mass T-Cell Antigen Secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun 1995 May；63(5)：1710-1717.
4) Berthet FX., et al.：A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein(CFP-10). Microbiology 1998 Nov.；144(pt 11)：3195-3203.
5) Brock I., et al.：Specific T-Cell Epitopes for Immunoassay-Based Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* Infection. J Clin Microbiol 2004 Jun.；42(6)：2379-2387.
6) Aagaard C., et al.：Mapping Immune Reactivity toward Rv2653 and Rv2654: Two Novel Low-Molecular-Mass Antigens Found Specifically in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. J Infect Dis 2004 Mar.；189(5)：812-819.
7) Harada N., et al.：Comparison of the sensitivity and specificity of two whole blood interferon-gamma assay for *M. tuberculosis* infection. J Infect 2008 May；56(5)：348-353.

※※**【お問い合わせ先】**

日本ビーシージー製造株式会社　カスタマーセンター
〒112-0012　東京都文京区大塚一丁目5番21号
TEL（03)5395-5590
FAX（03)5395-5580

【製造販売業者の氏名又は名称及び住所】

選任製造販売業者（輸入元）

日本ビーシージー製造株式会社
〒204-0022　東京都清瀬市松山三丁目1番5号

外国特例承認取得者及び製造元

セレスティス リミテッド Cellestis Limited（オーストラリア）
http://www.cellestis.com

技術導入先
SSI Technology

STATENS SERUM INSTITUT

Antigens licensed from Statens Serum Institut